

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 38/48, 31/70	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/58667 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Dezember 1998 (30.12.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/03769 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Juni 1998 (19.06.98) (30) Prioritätsdaten: 197 26 253.8 20. Juni 1997 (20.06.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MUCOS PHARMA GMBH & CO. [DE/DE]; Malvenweg 2, D-82538 Geretsried (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STAUDER, Gerhard [DE/DE]; Primelweg 2, D-82538 Geretsried (DE). RANSBERGER, Karl [DE/DE]; Seepromenade 5, D-82402 Seeshaupt (DE). (74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: USE OF AT LEAST ONE PROTEOLYTIC ENZYME FOR TREATING GLOMERULONEPHRITIS (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON MINDESTENS EINEM PROTEOLYTISCHEN ENZYM ZUR BEHANDLUNG VON GLOMERULONEPHRITIS (57) Abstract <p>The invention relates to the use of at least one proteolytic enzyme and optionally, rutin, for treating glomerulonephritis. The proteolytic enzyme used is preferably trypsin, bromelain or papain or a combination thereof.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym und gegebenenfalls Rutosid zur Behandlung von Glomerulonephritis. Als proteolytisches Enzym wird bevorzugt Trypsin, Bromelain oder Papain oder eine Kombination derselben eingesetzt.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabon	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym zur Behandlung von Glomerulonephritis

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym und gegebenenfalls Rutin zur Behandlung von Glomerulonephritis. Als proteolytisches Enzym wird bevorzugt Trypsin, Bromelain oder Papain oder eine Kombination derselben eingesetzt.

Glomerulonephritis ist ein Sammelbegriff für sehr verschiedenartige, bakterielle, Nierenerkrankungen mit Entzündungsvorgängen in den Nierenkörperchen und sekundär in anderen Teilen der Nephronen und des Interstitiums. Während einer Glomerulonephritis kann es zur Einlagerung von Immunkomplexablagerungen innerhalb der Gewebe kommen. Experimentelle Modelle der membranösen Glomerulonephritis können eine schwere Proteinurie, oft begleitet von einem nephrotischen Syndrom, auslösen. Häufig kommt es bei der Serum-Nephritis und der autologen Phase der Heymann Nephritis auch zu einer Hypercholesterolemie. Eine Form der aktiven Serum-Nephritis, die durch Immunisierung von Mäusen mit Dextranen induziert wird, löst eine spontane IgA-Nephropathie bei Patienten aus. Daraufhin akkumulieren sich überzählige, mesangiale Ablagerungen und einige kapilläre Ablagerungen, hauptsächlich mit IgA, in den Glomeruli. Es tritt außerdem eine signifikante Hämaturie und manchmal eine Proteinurie auf.

Da die Glomerulonephritis also mit einer Vielzahl ernster Probleme für den Körper einhergeht und eine Therapie in einigen Fällen schwierig ist, werden Anstrengungen in vielen Richtungen unternommen, um die Krankheit zu heilen oder doch zumindest ihre Symptome und Beschwerden zu verringern.

Neben einer Antibiotikatherapie wird daher ein verstärktes Augenmerk auf unterstützende Mittel gerichtet, die die Behandlung ergänzen oder verstärken.

Die Behandlung verschiedener Krankheitszustände mit Proteinasen ist seit einiger Zeit bekannt. Solche Proteinasen sind z.B. Papain, Trypsin und Bromelain.

Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, daß die Wirkung von Proteinasen in der Regel auf einem Eingriff in das Immunsystem beruht.

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, ein weiteres Medikament zur Behandlung von Glomerulonephritis zur Verfügung zu stellen. Dieses Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch die in Anspruch 1 angegebene Erfindung. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung.

Überraschend wurde gefunden, daß Proteinasen, gegebenenfalls in Kombination mit Rutin auch bei einer Krankheit wie der Glomerulonephritis wirken.

Gemäß Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym und gegebenenfalls Rutin zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Glomerulonephritis vorgesehen.

Es wird angenommen, daß die enzymatische Auflösung der glomerulären Immunablagerungen dem therapeutischen Effekt zugrunde liegen, obwohl andere Mechanismen, wie z.B. eine veränderte zelluläre Expression von Cytokinen und Cytokinrezeptoren, von endogenen Gewebemetalloproteasen und zellulären Adhäsionsmolekülen ebenfalls potentielle Ziele der Proteasen sind, wie auch eine Reduktion der hyperaktiven T-Zellen.

Vorzugsweise wird als proteolytisches Enzym Trypsin, Bromelain oder Papain verwendet oder eine Kombination von einem oder mehreren dieser Enzyme.

Die erfindungsgemäß verwendeten Enzyme lassen sich kostengünstig aus den folgenden Rohmaterialien isolieren.

Bromelain ist ein proteolytisches wirksames Enzym aus dem Preßsaft der Ananas und kann auch noch aus reifen Früchten isoliert werden.

Papain ist ein proteolytisches Enzym, das aus dem Milchsafte der unreifen, fleischigen Früchte des Melonenbaums *Carica Papaya* gewonnen wird. Reines Papain ist ein kristallines Polypeptid mit einem MG. von 23350, das aus einer Kette von 212 Aminosäureresten mit 4 Disulfid-Brücken besteht; die Sequenz und Raumstruktur sind bekannt. Papain wird vielfältig eingesetzt: Aufgrund seiner Protein-spaltenden Eigenschaft als "Fleischzartmacher" oder "Mürbesalz", zum Klären von Bier, zur Brot- und Hartkeksherstellung, in der Lederzubereitung, in der Textil-Industrie zum Entbasten von Seide und zur Verhinderung von Wollverfilzung, in der Tabak-Industrie zur Qualitätsverbesserung, zur Rückgewinnung von Silber aus verbrauchtem photographischem Material, ferner in der Bakteriologie zur Pepton-Gewinnung. In der Medizin dient Papain bereits zur Unterstützung der enzymatischen Verdauung, zur enzymatischen Wundreinigung und als Zusatz zu Zahnprothese-Reinigungsmitteln. Für Spezialzwecke werden Papain-Präparate auch an Kunststoffpolymere oder an Agaroseträger gebunden angeboten. Papain ist auch als Katalysator zur Synthese von Oligopeptiden verwendet worden.

Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, das ebenfalls im Pankreas gebildet wird und in Verbindung mit anderen Enzymen bereits therapeutisch eingesetzt wird. Es gehört zu den Serin-Proteinasen. Kristallines Trypsin hat ein MG. von ca. 23300, ist in Wasser, nicht aber in Alkohol löslich, besitzt ein Wirkungsoptimum bei pH 7-9 und spaltet Peptid-Ketten spezifisch Carboxy-seitig der basischen Aminosäurereste L-Lysin und L-Arginin. Die räumliche Struktur des aus 223 Aminosäuren bestehenden Trypsins ist bekannt.

Weiterhin kann zusätzlich Rutosid dem Medikament beigemischt werden. Rutosid, auch als Rutin bekannt, ist ein Glycosid, das zu den Flavonoiden gehört.

Eine besonders gute Wirksamkeit zeigt sich bei der Verwendung einer Kombination der Enzyme Bromelain, Papain und/oder Trypsin. Neben der bemerkenswerten und unerwarteten Wirkung dieser Enzyme auf die Verbesserung eines Glomerulonephritis-Krankheitszustandes hat die kombinierte Verwendung der ge-

nannten Enzyme weiterhin den Vorteil, daß auch bei einer Langzeitanwendung keine schädigenden Nebenwirkungen auftreten.

Eine besonders gute Wirksamkeit hat die kombinierte Verwendung von 20 bis 100 mg Bromelain, 40 bis 120 mg Papain und 10 bis 50 mg Trypsin pro Dosisseinheit.

Ganz besonders bevorzugt ist eine Kombination von 90 mg Bromelain, 120 mg Papain und 100 mg Rutosid x 3H₂O.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird eine Kombination von 48 mg Trypsin, 90 mg Bromelain und 100 mg Rutosid x 3H₂O verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden 10 bis 100 mg, besonders bevorzugt 100 mg Rutosid x 3 H₂O pro Dosiseinheit verwendet.

Das Medikament kann weiterhin alle üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthalten.

Als Hilfs- und Trägerstoffe kommen z.B. Lactose, Magnesiumstearat, Stearinsäure, Talkum, Methacrylsäure, Copolymerisat Typ A, Shellack, Makrogol 6000, Dibutylphthalat, Vanillin, Titandioxid, weißer Ton, Polyindon, gelbes Wachs und Carnaubawachs in Frage.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung im einzelnen erläutern.

Beispiel 1

Material und Methoden

1. Material

Es wurde das Zellkulturmedium RPMI 1640 mit folgenden Zusätzen verwendet: NaHCO₃ (Biochrom, 2 g/l); L-Glutamin (Biochrom, 2 mM), Na-Pyruvat (Biochrom, 1 mM), NaN₃ (Sigma, 0,01 %).

Im Falle einer Stimulation der Zellen wurde entweder Phythämagglutinin M (Biochrom, 5 µg/ml) oder γ -Interferon (100 U/ml) eingesetzt. Die Stimulation der Zellen erfolgte dabei über 1-3 Tage mit Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (Biochrom).

Als Targets für die zu untersuchenden Enzyme wurden frisch isolierte, humane, periphere, mononukleäre Blutzellen (Citratblut) verwendet. Nach der üblichen Isolation mittels Ficoll wurden die Zellen mehrfach gewaschen und frisch bei den Experimenten eingesetzt. Neutrophile Granulozyten wurden ebenfalls aus frischem Citratblut isoliert. Hierbei erfolgte die Abtrennung von den Lymphozyten/Monozyten mittels eines 2-Stufen-Ficoll-Gradienten.

2. Verwendete monoklonale Antikörper

Für die spezifische Erkennung der Oberflächenstrukturen der Leukozyten wurden monoklonale Antikörper verwendet. Diese erkennen auf den entsprechenden Antigenen jeweils ein definiertes Epitop, welches bei den von uns untersuchten Antigenen nur ein einziges Mal in der Struktur vorkommt. In Übersicht 1 sind die untersuchten Oberflächenmarker, die monoklonalen Antikörper sowie die analysierten Targetzellen dargestellt.

Übersicht 1: Analysierte Oberflächenmarker, verwendete monoklonale Antikörper und Targetzellen der Enzymbehandlung

Marker	Epitop AK-Bez.	Fluorochrom	Produzent	Target-Zelle
CD2	Leu5b	PE ¹	B.D. ³	T-Lymphozyten
CD4	Leu3a	PE	B.D.	T-Lymphozyten
	OKT4	FITC ²	Ortho ⁴	T-Lymphozyten
CD11b	Leu15	PE	B.D.	Granulozyten
CD25	IL-2R	PE	B.D.	PHA-Blasten

- ¹ Phycoerythrin, rot Fluoreszenz;
- ² Fluoresceinisothiocyanat, grüne Fluoreszenz;
- ³ Becton Dickinson, Heidelberg;
- ⁴ Ortho Diagnostics

3. Inkubationsbedingungen

Die frisch isolierten und aufbereiteten Zellen wurden mit den Enzymen Bromelain, Papain und Trypsin (Arzneimittel-Inhaltsstoffe der Fa. Mucos) mit den jeweils in den Legenden der Tabellen und Abbildungen angegebenen Konzentrationen inkubiert. Bei der Mischung der drei Enzyme entsprach das Mischungsverhältnis 22,7 : 15,5 : 11,9 (Bromelain : Papain : Trypsin, bezogen auf 40 µg/ml, "BPT"). Es wurden drei Enzymkonzentrationen (40, 10, 2,5 µg/ml) untersucht. Die Inkubation fand in serumfreiem Medium bei 37°C statt.

Die Proteasen wurden unmittelbar vor den Inkubationen angesetzt. In den Zellkulturmedien war 0,01 % Natriumazid enthalten. Durch diesen Zusatz werden die Zellen daran gehindert, während des Inkubationsprozesses oder der Waschvorgänge Rezeptormoleküle erneut zu exprimieren. Nach dem Auswaschen des Zellkulturmediums sind die Zellen wieder aktivierbar (nicht demonstriert).

Nach entsprechender Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Enzymen, Auswaschen der Enzyme und der Markierung mit monoklonalen Antikörpern (nach Angaben der Hersteller) wurde sofort die Analyse der Oberflächenmarker vorgenommen.

4. Analytische Durchflußcytometrie

Alle Untersuchungen zur Modulation von Zelloberflächenmolekülen wurden mittels analytischer Durchflußcytometrie (FACSCAN, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) unter Verwendung einer gerätespezifischen Software (Lysis I) durchgeführt. Bei entsprechender Einstellung des Gerätes sowie der Mitführung von Referenzen,

d.h. Zellen, die ohne Enzyme aber in derselben Prozedur behandelt wurden, erfolgte die Messung.

Für jede Subklasse der monoklonalen Antikörper wurde eine entsprechende fluoreszenzkonjugierte Isotypenkontrolle mitgeführt. Hierbei handelt es sich um Maus-Immunglobulin, mit welchem die Kapazität der unspezifischen Bindung der Targetzellen flußcytometrisch erfaßt wird.

Pro Histogramm wurden 10 000 Zellen gemessen. Die jeweilige Zellpopulation wurde mit einem sogenannten "elektronischen Gate" separiert, in dem sich dann mindestens 3 500 Zellen befanden.

5. Darstellung der Ergebnisse

Die Auswertung und Analyse der Daten erfolgte unabhängig vom Meßvorgang auf dem Durchflußcytometer mittels einer gerätespezifischen Software. Dabei wurden jeweils die Histogramme der Kontrollen, d. h. der unbehandelten Zellproben, mit den Histogrammen der enzymbehandelten Zellen verglichen.

Die Rohdarstellung umfaßt ein optisch eindrucksvolles, aber relativ unübersichtliches Histogramm, bei dem verschiedene Einzelmessungen übereinander gelagert abgebildet sind. Hier läßt sich insbesondere die Wirkung der Enzyme im Vergleich zur Referenz optisch transparent machen. Für diese Untersuchungen ist nicht der prozentuale Anteil einer Subpopulation an der gesamten Leukozytenpopulation die Meßgröße, sondern die relative Rezeptordichte, die sich als Fluoreszenzintensität darstellt.

Aus diesen Histogrammen, die beispielhaft sind und illustrativen Charakter haben, lassen sich Daten ableiten, welche die relative Fluoreszenzintensität der Einzelmessung reflektieren. Diese ist ein Maß für die relative Rezeptor- oder Oberflächenmoleküldichte b_i einer gemessenen Zellpopulation.

Die Säulengraphiken zeigen in logarithmischer Darstellung den Median der relativen Fluoreszenz. Es läßt sich so gegenüber der Referenz die Reduktion der Dichte des jeweiligen Oberflächenmoleküls in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration darstellen.

In den Tabellen sind die Daten unabhängiger Experimente enthalten. Die Nummern der Spender haben nur für die jeweilige Tabelle Gültigkeit und sind nicht auf andere Tabellen übertragbar. Wird in der Tabelle beispielsweise ein Wert von 40 % angegeben, so bedeutet das, daß bei diesem Antigen 40 % aller Oberflächenmoleküle durch das Enzym so verändert ist, daß der spezifische monoklonale Antikörper sein Epitop nicht mehr erkennt. Wird keine Reduktion beobachtet, so erscheint in den Tabellen der Wert "0". Die angegebene Prozentzahl drückt somit die Enzymleistung gegenüber den einzelnen Antigenen aus. Werte bis zu 20 % werden im Einzelfall als nicht relevant angesehen.

Für eine Bewertung der Wirkung der Enzyme auf die einzelnen Antigene ist es günstig, einen geeigneten Vergleichsmaßstab zu wählen. Bis auf wenige Ausnahmen wurden alle Untersuchungen unter standardisierten Inkubationsbedingungen durchgeführt. Damit kann für diese experimentellen Bedingungen die aus früheren Forschungsberichten bekannte Halbeffektkonzentration angegeben werden.

Zur Berechnung der Halbeffektkonzentration wurden die Daten mittels nicht-linearer Regression ausgewertet. Der Median der Fluoreszenzintensität versus eingesetzter Enzymkonzentration und Referenz werden zueinander in Beziehung gesetzt, und daraus läßt sich die Menge an Enzym berechnen, die zu einer 50%igen Reduktion der relativen Fluoreszenzintensität bzw. der in der Struktur veränderten Rezeptordichte führt.

Abbildung 1: CD2-Modulation durch Proteasen; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: Lymphozyten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD2 spezifischen monoklo-

nen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von Spender 1 (vgl. Tab. 1) als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

Abbildung 2: CD4 (Epitop Leu3a)-Modulation durch Proteasen; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: Lymphozyten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD4 spezifischen, monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von Spender 2 (vgl. Tab. 2) als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

Abbildung 3: CD4 (Epitope OKT4 und Leu3a)-Modulation durch Trypsin; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: Lymphozyten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD4 spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von einem Spender (vgl. Tab. 3) als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

Abbildung 4: CD11b-Modulation durch Proteasen; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: Granulozyten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD11b spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von einem Spender als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

Abbildung 5: CD25-Modulation durch Proteasen; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: PHA-Blasten. Die Positivkontrolle

(Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD25 spezifischen, monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von Spender 1 als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

Abbildung 6: Reduktion der Leu3a-Antigendichte durch Trypsin. Frisch isolierte humane periphere, mononukleäre Blutzellen wurden mit Trypsin im serumfreien Medium inkubiert, anschließend gewaschen und mit dem monoklonalen Antikörper anti-Leu3a markiert. Die Reduktion der relativen Fluoreszenzdichte von CD4 der Lymphozytenpopulation ist das Maß der Enzymaktivität. Die Halbeffektkonzentration von Trypsin gegenüber dem Epitop Leu3a von CD4 wird über die gefittete Kurve berechnet.

Ergebnisse

Tabelle 1: CD2-Modulation durch Proteasen; Targetzellen: Lymphozyten. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Mediums der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Ergebnisse von drei Experimenten mit Zellen von drei verschiedenen Spendern dargestellt.

Enzym	Nr.	40 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml
Bromelain	1	11,1	17,9	17,4
	2	6,1	12,2	14,3
	3	0	0	0
Papain	1	22,4	21,4	34,7
	2	5,4	9,5	17,0
	3	0	0	0
Trypsin	1	75,7	73,6	73,0
	2	83,7	21,1	0,7
	3	96,3	85,4	50,9

BPT	1	71,9	54,7	38,2
	2	74,1	8,8	18,4
	3	94,8	72,6	25,2

Tabelle 2: CD4(Epitop Leu3a)-Modulation durch Proteasen; Targetzellen: Lymphozyten. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Ergebnisse von zwei Experimenten mit Zellen von zwei verschiedenen Spendern dargestellt.

Enzym	Nr.	40 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml
Bromelain	1	24,6	0	0
	2	16,2	0	0
Papain	1	2,5	3,2	0
	2	0	0	5,7
Trypsin	1	99,3	93,0	64,1
	2	99,4	96,2	57,5
BPT	1	98,3	49,3	23,0
	2	99,4	79,2	20,2

Tabelle 3: Modulation der CD4-Epitope Leu3a und OKT4 durch Trypsin; Targetzellen: Lymphozyten. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Daten von einem Spender dargestellt.

Enzym	Epitop	40 µg/ml	20 µg/ml	10 µg/ml
Trypsin	Leu3a	98,5	96,7	87,1
	OKT4	6,5	6,3	19,5
	Epitop	5 µg/ml	2,5 µg/ml	1,25 µg/ml
Trypsin	Leu3a	65,2	41,9	28,8
	OKT4	13,3	10,8	9,3

Tabelle 4: CD11b-Modulation durch Proteasen; Targetzellen: Granulozyten. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Ergebnisse von drei Experimenten mit Zellen von drei verschiedenen Spendern dargestellt.

Enzym	Nr.	40 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml
Bromelain	1	0	0	26,4
	2	0	0	n.d.
	3	13,5	8,1	27,5
Papain	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	7,9	35,9	20,0
Trypsin	1	0	0	n.d.
	2	17,0	0	0
	3	19,0	1,9	13,9
BPT	1	0	4,3	n.d.
	2	0	0	0
	3	3,1	8,6	4,7

Tabelle 5: CD25-Modulation durch Proteasen; Targetzellen: Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Ergebnisse von zwei Experimenten mit Zellen von zwei verschiedenen Spendern dargestellt. Vor dem Experiment wurden die Zellen 3 Tage mitogenstimuliert.

Enzym	Nr.	40 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml
Bromelain	1	90,7	80,1	59,7
	2	62,6	43,6	0
Papain	1	92,2	81,0	60,7
	2	62,6	43,6	0
Trypsin	1	91,2	88,2	71,0
	2	78,9	73,9	52,8

BPT	1	92,1	89,7	50,9
	2	79,4	44,1	12,2

Tabelle 6: Berechnete Halbeffektkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) von Bromelain, Papain, Trypsin und deren Kombination für die 50 %ige Reduktion der Dichte von zellulären Oberflächenmolekülen. Die Enzyminkubation betrug 1 Stunde.

Enzyme	CD2	CD4 ³	CD25 ⁴
Bromelain Halbeffektkonz. ¹	n w	n w	18,4
Bereich ²	-	-	14-23
Papain Halbeffektkonz. ¹	n w	n w	12,4
Bereich ²	-	-	11-14
Trypsin Halbeffektkonz. ¹	1,5	2,5	< 2,5
Bereich ²	1-2	2,3-3,1	
B-P-T ⁵ Halbeffektkonz. ¹	9,3	16,4	16,0
Bereich ²	7,5-14	15,5-18	13-19

¹ berechnet aus Mittelwerten von 2 oder 3 unabhängigen Experimenten

² minimaler und maximaler Wert, 95 % Konfidenzbereich = 1 δ , geschätzt

³ Modulation von CD4-Epitop Leu3a

⁴ auf stimulierten Zellen präsent

⁵ Mischung der Proteasen im Verhältnis 22,7 : 15,5 : 11,9
- Bromelain : Papain : Trypsin

n w: nicht wirksam im untersuchten System (max. 40 μg Enzym/ml, 1 h Inkubation)

Patentansprüche

1. Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym und gegebenenfalls mit Rutin zur Behandlung von Glomerulonephritis.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als proteolytisches Enzym Trypsin, Bromelain oder Papain verwendet wird oder eine Kombination zweier oder mehrerer dieser Enzyme.
3. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Rutosid verwendet wird.
4. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß 20 bis 100 mg Bromelain, 40 bis 120 mg Papain und 10 bis 50 mg Trypsin pro Doseinheit verwendet werden.
5. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß 90 mg Bromelain, 120 mg Papain und 100 mg Rutosid pro Doseinheit verwendet werden.
6. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß 90 mg Bromelain, 48 mg Trypsin und 100 mg Rutosid pro Doseinheit verwendet werden.
7. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß 10 bis 100 mg, vorzugsweise 10 mg Rutosid x 3H₂O pro Doseinheit verwendet werden.

1/6

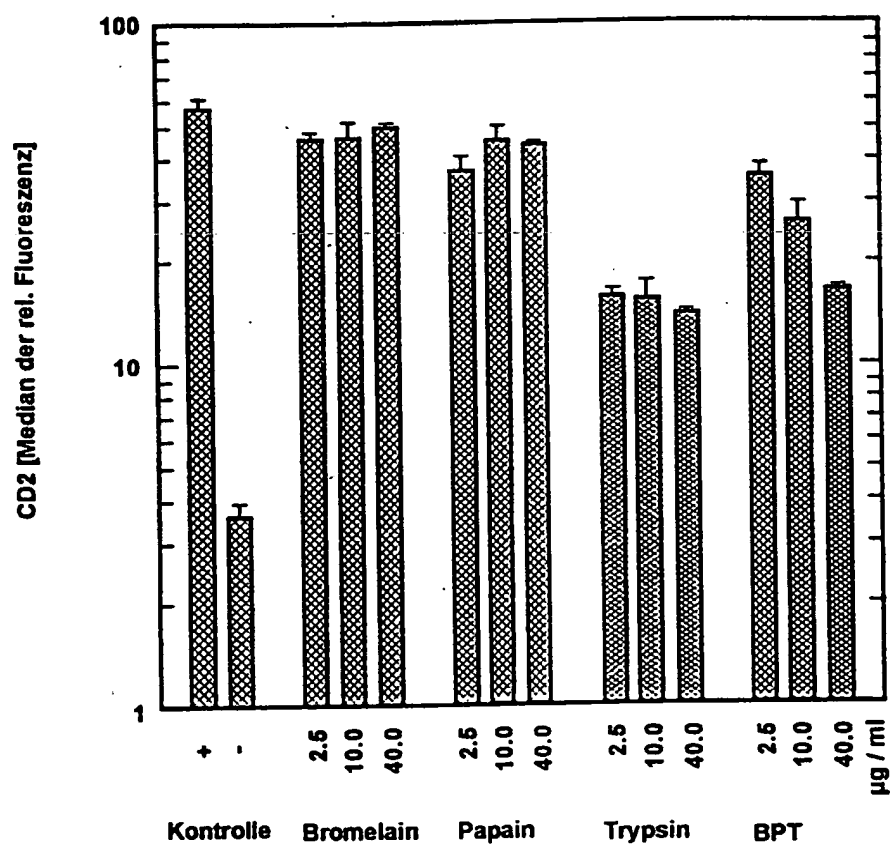


Fig. 1

2/6

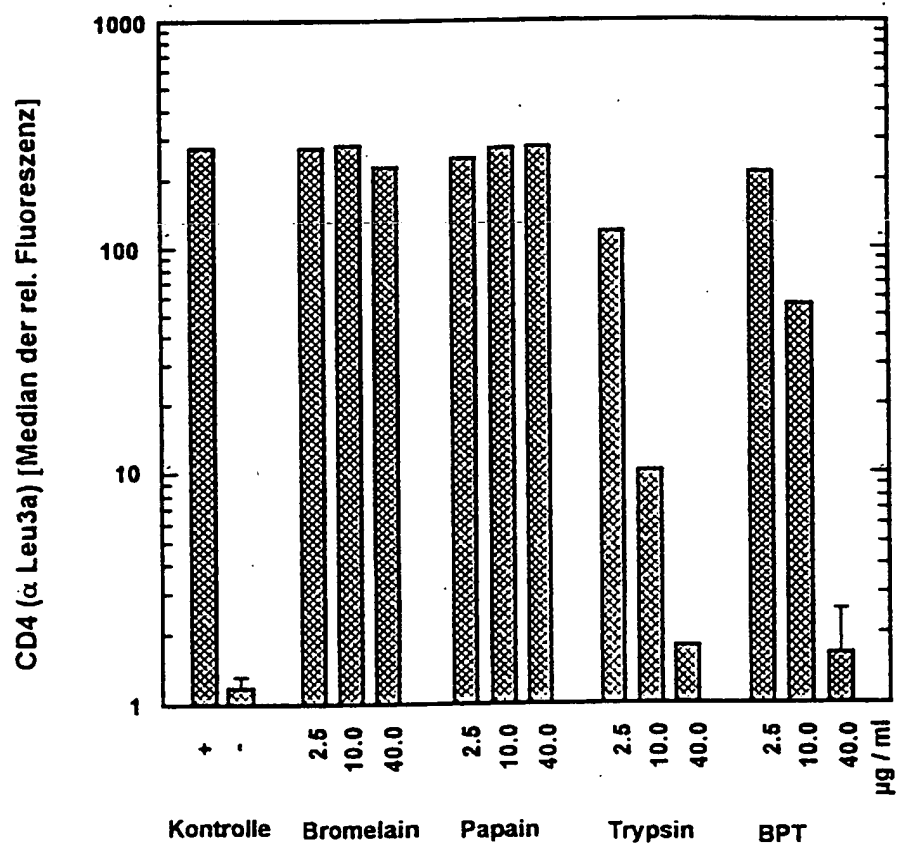


Fig. 2

3/6

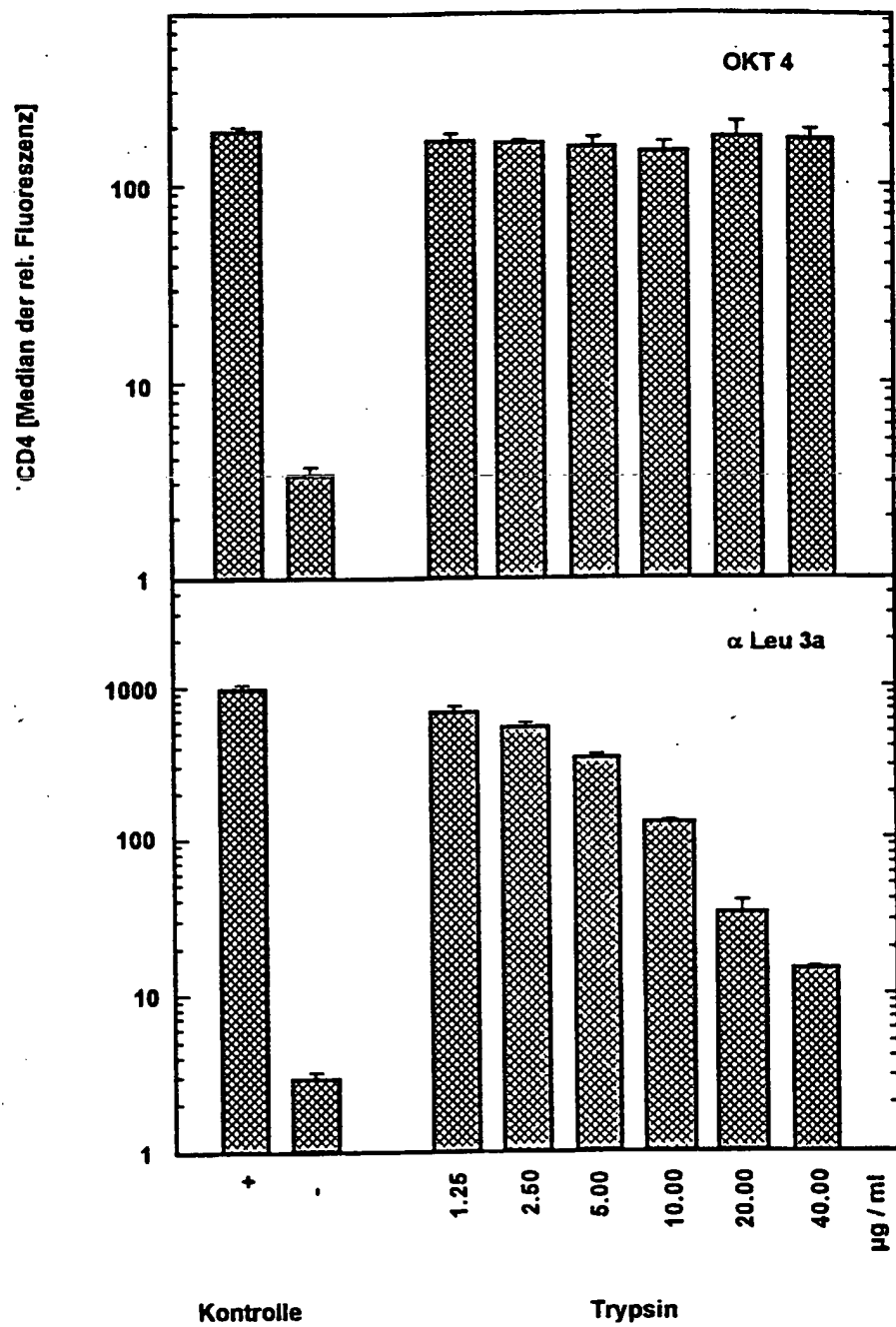


Fig. 3

4/6

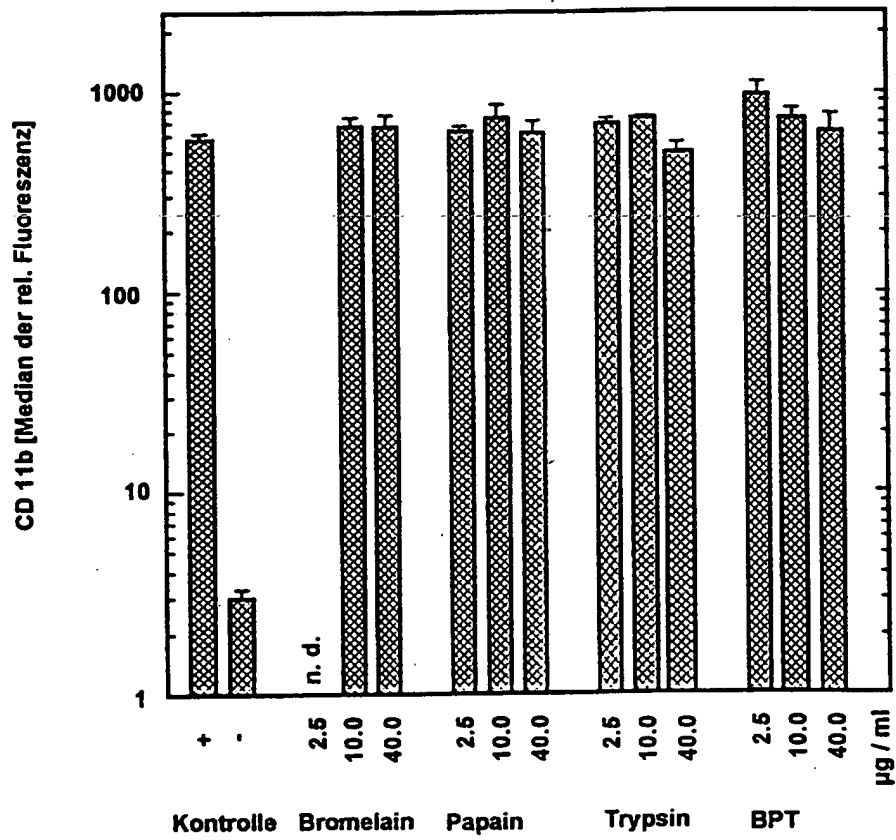


Fig. 4

5/6

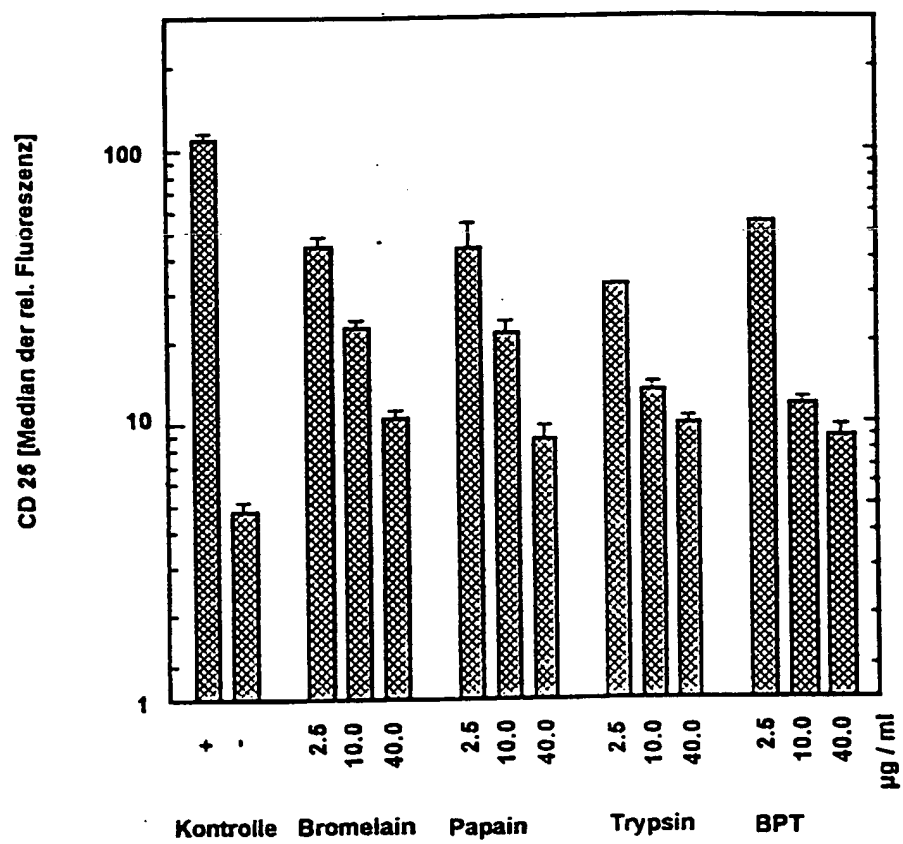


Fig. 5

6/6

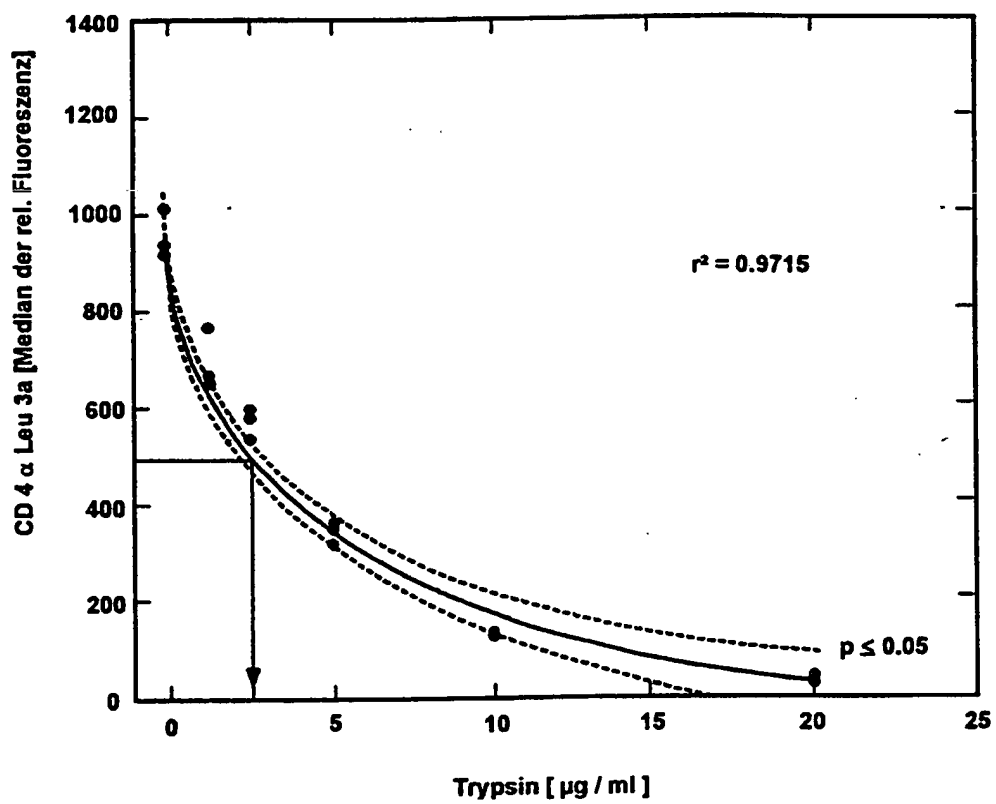


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/03769

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K38/48 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEBEKOVA ET AL.: "Amelioration of the progressive course of chronic renal failure in subtotaly nephrectomized rats by intraperitoneal enzyme therapy" NIEREN AND HOCHDRUCKKRANKHEITEN, vol. 26, no. 6, June 1997, pages 277-281, XP002082401 see "Introduction" see "Discussion"	1-3
A	--- -/--	6



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 October 1998

Date of mailing of the international search report

24/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alvarez Alvarez, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/03769

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKAZAWA ET AL.: "Proteolytic enzyme treatment reduces glomerular immune deposits and proteinuria in passive Heymann nephritis" JOURNAL EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 164, no. 6, December 1986, pages 1973-1987, XP002082402 see abstract	1
X	WO 97 05244 A (BERDNT ET AL.) 13 February 1997 see page 9, line 15 - line 23	1
A	EP 0 421 023 A (MUCOS EMULSIONSGESELLSCHAFT M.B.H.) 10 April 1991	
A	EP 0 309 602 A (MUCOS PHARMA GMBH & CO.) 5 April 1989	
X,P	EMANCIPATOR ET AL.: "Oral enzymes in different animal models of glomerulonephritis" INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 13, no. 3-4, 1997, pages 97-103, XP002082403 see abstract see page 99, column 2, line 1 - line 5 see "Discussion"	1-3
X,P	SEBEKOVA ET AL.: "Systemic treatment with proteolytic enzymes in rat models of nonimmune mediated renal diseases" INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 13, no. 3-4, 1997, pages 79-83, XP002082404 see abstract see page 80, column 2, line 2 - line 4 see "Discussion"	1-3
X,P	SEBEKOVA ET AL.: "Effects of protease therapy in the remnant kidney model of progressive renal failure" MINERAL AND ELECTROLYTE METABOLISM, vol. 23, no. 3-6, May 1997 - December 1997, pages 291-295, XP002082405 see abstract	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/03769

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9705244 A	13-02-1997	US 5659018 A AU 6467696 A EP 0842269 A	19-08-1997 26-02-1997 20-05-1998
EP 421023 A	10-04-1991	AT 119780 T DE 58909121 D GR 3015924 T US 5223406 A	15-04-1995 20-04-1995 31-07-1995 29-06-1993
EP 309602 A	05-04-1989	US 5002766 A	26-03-1991

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03769

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K38/48 A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SEBEKOVA ET AL.: "Amelioration of the progressive course of chronic renal failure in subtotaly nephrectomized rats by intraperitoneal enzyme therapy" NIEREN UND HOCHDRUCKKRANKHEITEN, Bd. 26, Nr. 6, Juni 1997, Seiten 277-281, XP002082401 siehe "Introduction" siehe "Discussion"	1-3
A	---	6
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Oktober 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24/11/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Alvarez Alvarez, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NAKAZAWA ET AL.: "Proteolytic enzyme treatment reduces glomerular immune deposits and proteinuria in passive Heymann nephritis" JOURNAL EXPERIMENTAL MEDICINE, Bd. 164, Nr. 6, Dezember 1986, Seiten 1973-1987, XP002082402 siehe Zusammenfassung MTC	1
X	WO 97 05244 A (BERDNT ET AL.) 13. Februar 1997 siehe Seite 9, Zeile 15 - Zeile 23	1
A	EP 0 421 023 A (MUCOS EMULSIONSGESELLSCHAFT M.B.H.) 10. April 1991	
A	EP 0 309 602 A (MUCOS PHARMA GMBH & CO.) 5. April 1989	
X,P	EMANCIPATOR ET AL.: "Oral enzymes in different animal models of glomerulonephritis" INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, Bd. 13, Nr. 3-4, 1997, Seiten 97-103, XP002082403 siehe Zusammenfassung siehe Seite 99, Spalte 2, Zeile 1 - Zeile 5 siehe "Discussion"	1-3
X,P	SEBEKOVA ET AL.: "Systemic treatment with proteolytic enzymes in rat models of nonimmune mediated renal diseases" INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, Bd. 13, Nr. 3-4, 1997, Seiten 79-83, XP002082404 siehe Zusammenfassung siehe Seite 80, Spalte 2, Zeile 2 - Zeile 4 siehe "Discussion"	1-3
X,P	SEBEKOVA ET AL.: "Effects of protease therapy in the remnant kidney model of progressive renal failure" MINERAL AND ELECTROLYTE METABOLISM, Bd. 23, Nr. 3-6, Mai 1997 - Dezember 1997, Seiten 291-295, XP002082405 siehe Zusammenfassung	1-3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03769

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9705244 A	13-02-1997	US 5659018 A	19-08-1997
		AU 6467696 A	26-02-1997
		EP 0842269 A	20-05-1998
EP 421023 A	10-04-1991	AT 119780 T	15-04-1995
		DE 58909121 D	20-04-1995
		GR 3015924 T	31-07-1995
		US 5223406 A	29-06-1993
EP 309602 A	05-04-1989	US 5002766 A	26-03-1991